Wechselwirkungen zwischen Aspergillaceen und Kulturpflanzen in Mischkultur

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Ursula Ebner

aus Basel

1967

Büchler + Co AG Wabern – 1968

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der Herren Professoren Dr. M. Geiger-Huber
Dr. Hch. Zoller

Basel, den 28. Februar 1967

Prof. Dr. H. Huber, Dekan

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Separatabdruck aus «Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft»
1968, Band 78
(Als Sonderdruck ausgegeben am 8. Oktober 1968)

Wechselwirkungen zwischen Aspergillaceen und Kulturpflanzen in Mischkultur

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Ursula Ebner

aus Basel

Büchler + Co AG Wabern – 1968

Wechselwirkungen zwischen Aspergillaceen und Kulturpflanzen in Mischkultur

Von *Ursula Ebner*

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel)

Manuskript eingegangen am 26. September 1967

Inhalt

Einleitung 66
Methode 67
Versuchspflanzen 67
Nährlösung 68
Durchführung der Versuche 68
Auswertung der Versuche 69
Versuche 70
Zea Mays in Mischkultur mit *Penicillium citrinum*, *Penicillium patulum* und *Aspergillus terreus* 71
Einfluss der Nährlösungstemperatur 73
Einfluss der Tageslänge 76
Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration 78
Einfluss der Konzentration an Nährionen 81
Avena sativa in Mischkultur mit *Penicillium citrinum*, *Penicillium patulum* und *Aspergillus terreus* 84
Pisum sativum in Mischkultur mit *Aspergillus terreus*, *Penicillium citrinum* und *Penicillium patulum* 86
Diskussion 88
Zusammenfassung 91
Literatur 92

Einleitung

Zwischen höheren Pflanzen und Mikroorganismen, die in ihrem Wurzelhorizont leben, bestehen mannigfaltige Beziehungen: Pilzmyzelien umwachsen Wurzeln, sie bilden Mykorrhizen; auch kann es zu einer Konkurrenz um Ionen kommen, oder der eine Partner schliesst schwerlösliche Salze auf, die dadurch auch dem andern zugänglich werden. Durch Ausscheidung von Stoffen (z.B. Antibiotika oder Vitaminen) können sich höhere Pflanzen und Mikroorganismen zudem gegenseitig hemmen oder fördern. Bei diesen wechselseitigen Beziehungen spielen wohl auch ökologische Faktoren eine wichtige Rolle; unter sich ändernden Umweltsbedingungen wird das «Gleichgewicht» zwischen höheren Pflanzen und Mikroflora auf die Seite des einen oder des andern Partners verschoben werden.

Über die Beziehungen zwischen höheren Pflanzen und ihrer Bodenmikroflora gibt es zahlreiche Arbeiten. Clark (1949) ordnete in einem historischen Überblick die damaligen Kenntnisse von den Wechselwirkungen zwischen höheren Pflanzen und der in ihrem Wurzelhorizont lebenden Mikroflora. Mit der Konkurrenz um Nährionen befassten sich Krüger und Schneidewind (1901), Barker und Broyer (1942) und Akhromeiko und Shestakova (1958), um Spurenelemente Vöchting (1953) und um Ballastionen Frei (1963). Zahlreiche Arbeiten liegen vor über Stoffausscheidungen, die das Verhältnis zwischen höheren Pflanzen und Mikroben beeinflussen: Rasnizina (1938), West und Lochhead (1940), Timonin (1941), Steinberg (1947), Kerr (1956), Krasil'nikov (1957), Krasil'nikov und Kotelev (1959), Buxton (1958), Gebgardt und Koval'chuk (1958), Martin (1958), Bowen (1961), Husain und McKeen (1963), Klarman und Gerdemann (1963), Rivière (1963), Schroth und Teakle (1963), Schroth, Toussoun und Snyder (1963) und Kato, Shiotani, Tamura und Sakurai (1964).

Die meisten Autoren untersuchten, wie Mikroorganismen auf grüne Pflanzen einwirken; weniger jedoch kennt man den Einfluss der Gefässpflanzen auf das Wachstum und die Lebenstätigkeit der Mikroben. Die Mikroben des Bodens tragen, wie die grünen Pflanzen, zur Erhaltung der anderen Lebewesen bei, so dass es von Bedeutung ist, zu wissen, ob und wie höhere Pflanzen auf die Mikroflora einwirken. In dieser Arbeit wurde die Entwicklung einiger höherer Pflanzen und einiger Pilze in gemeinsamer Kultur (Mischkultur) unter verschiedenen ökologischen Bedingungen untersucht.

Methode

Ich bediente mich der Methode von Vöchting (1953) und Frei (1963). Die Keimpflanzen und die Pilze wurden aseptisch, einzeln und zusammen aufgezogen, das Wachstum der beiden Partner gemessen und die Produktion der Pilze an Antibiotika bestimmt. Aufschluss über die gegenseitige Hemmung oder Förderung gibt der Vergleich zwischen Einzel- und Mischkultur.

Versuchspflanzen

Als höhere Pflanzen wählte ich zwei Monokotylen, *Zea Mays* L. und *Avena sativa* L., und als Vertreter der Dikotyledonen *Pisum sativum* L. Es wurden Ohio-Saatmais M34, Saathafer und Zwergerbsen (Grasigerbsen) verwendet. Keimpflanzen von Mais entwickeln sehr rasch eine kräftige Wurzel und Blätter, während Hafer langsamer, aber gleichmässiger wächst. Die Samen beziehungsweise Karyopsen dieser drei Pflanzen sind relativ gross, so dass die für Versuche geeigneten leicht ausgelesen werden können.

Es wurden solche Pilze ausgewählt, die Antibiotika produzieren, doch dürfen die Pilze die Keimpflanzen nicht zugrunde richten. Denn wenn man die Wechselwirkungen zwischen einer höheren Pflanze und einem Pilz studieren will, ist vorausgesetzt, dass beide Partner während der gemeinsamen Kultur am Leben bleiben. Unter natürlichen Bedingungen können andere Bodenmikroorganismen die pathogene Wirkung von Pilzen mildern (Eaton und Rigler, 1946; Ledingham, Sallans und Simmonds, 1949; Winter und von Rümker, 1950; Rangaswami und Vidyasekaran, 1963). Die verwendeten Pilze bilden eine Scheide vor allem um die Hauptwurzeln der Versuchspflanzen Frei (1963). Nach etwa 3–4 Tagen entwickeln sich auf der Kulturlösung Einzelkolonien. Beim Abbruch der Versuche lassen sich die Pilze leicht von den Wurzeln trennen.

Zwei der gewählten Pilze verwendete schon Frei (1963). Ich arbeitete mit folgenden Arten, die aus der Reinkulturensammlung in Baarn (Niederlande) stammen:

Aspergillus terreus Thom
Penicillium citrinum Thom, Stamm 806
Penicillium patulum Bainier, Stamm CCU III

Aspergillus terreus wurde gewählt, weil er dasselbe Antibiotikum (Citrinin) bildet wie *Penicillium citrinum*. Er entwickelt während der Versuchsdauer ein geschlossenes Myzel, kann aber auch einen Sporenrasen auf dünner Unterlage ausbreiten. In Einzelkultur, auf Bierwürzeagar und in Nährlösungen bildet *Aspergillus terreus* wenig Sporen.

Penicillium citrinum und *Penicillium patulum* produzieren in Mischkultur viel Antibiotikum. Die beiden *Penicillium*-Arten erzeugen während der Versuche immer Sporen auf teilweise zusammenhängenden Kolonien. *Penicillium citrinum* entwickelt in Mischkultur mit allen Pflanzen eine Sporendecke, während *Penicillium patulum* nur einige sporentragende Kolonien in Wurzelnähe aufweist.

Nährlösung

Bei der Wahl des Kultursubstrates kommt es darauf an, was man untersuchen will. Wird der Einfluss ökologischer Faktoren, zum Beispiel Boden und Klima, studiert, oder verfolgt man die Verbände der Mikroorganismen, die einander in den verschiedenen Wurzelregionen im Verlauf der Vegetationszeit ablösen, lässt man die Pflanzen am natürlichen Standort. Will man aber die wechselseitigen Beziehungen zwischen zwei bestimmten Organismen, einer höheren Pflanze und einem Pilz, erforschen, so muss ihre gemeinsame Kultur unter definierten Bedingungen erfolgen. Ich zog daher die Versuchspflanzen auf einer Nährlösung.

Die Nährlösung soll beiden Partnern das Wachstum ermöglichen. Den grünen Pflanzen genügt eine Ionenlösung, während den heterotrophen Pilzen noch zusätzlich eine Kohlenstoffquelle geboten werden muss. Da die Pilze in bezug auf Ionen anspruchsloser sind als die höheren Pflanzen, kann die Nährlösung deren Bedürfnissen angepasst werden. Als organischer Nährstoff dient Glukose. Für die Aufzucht von Mais verwendete ich dieselbe modifizierte Pfeffer-Robbins-Nährlösung wie Frei (1963); *Avena* und *Pisum* wuchsen auf einer Knop-Nährlösung (Martin, 1957). Die Pilze entwickelten sich auf beiden Nährlösungen; auf Knop-Nährlösung bildete jedoch *Penicillium citrinum* seine Sporen zwei Tage später. Da analysenreine Salze und destilliertes Wasser verwendet wurden, waren Spurenelemente notwendig. Wie Frei (1963) fügte ich pro Liter Nährlösung 1 ml modifizierte Hoaglandsche A-Z-Lösung zu. Mais, dem 10 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ und 1 ml $ZnSO_4$-Lösung (1,0 g $ZnSO_4$ in 18 l destilliertem Wasser) pro Liter Nährlösung zusätzlich geboten wurde, zeigte keine Streifenchlorose (Frei, 1963).

Zu Beginn der Kultur reagierten die beiden Nährlösungen leicht sauer, pH 4. Die Pilze und die höheren Pflanzen vermochten einzeln und in gemeinsamer Kultur die Nährlösung zu neutralisieren.

Als Kohlenstoffquelle gab ich allen Pilzen 0,5% Glukose. Bei dieser Zuckerkonzentration entwickelten sich die Pilze gerade so stark, dass sie die Keimpflanzen beeinflussen konnten. Höhere Konzentrationen lassen die Pilze die Wurzeln völlig überwuchern, zudem werden die osmotischen Verhältnisse ungünstig beeinflusst. Das «Gleichgewicht» zwischen den beiden Partnern kann also durch die Zuckerkonzentration geregelt werden. Im Gegensatz zu den Pilzen, die jederzeit ihr vegetatives Leben mit Dauerstadien, Sporen, unterbrechen können, sind die höheren Pflanzen, wenn einmal ausgekeimt, auf zuträgliche Verhältnisse angewiesen.

Durchführung der Versuche

Wenn man die Wechselwirkungen zwischen einem bestimmten Mikroorganismus und höheren Pflanzen untersuchen will, muss man die andern Mikroben von der Kultur fernhalten; die Versuche werden daher aseptisch durchgeführt. Mit dieser Methode schafft man zwar für die Pflanzen Bedingungen, wie sie in der Natur nie vorkommen, aber es sollen ja die physiologischen *Potenzen* der beiden Partner in gemeinsamer Kultur geprüft werden.

Die Aufzucht erfolgte auf Fernbachkolben mit je 150 ml Nährlösung. Die Nährlösung wurde in den Kolben eine halbe Stunde bei 1 atü sterilisiert. Um die Wurzeln und die Pilze im Dunkeln zu halten, wurden die Kolben mit Aluminiumfolie umwickelt.

Ich verwendete wie Frei (1963) Standkulturen. Da die Pflanzen nur eine Woche auf den Kolben wuchsen, wurden die Wurzeln durch mangelnden O_2-Zutritt noch nicht geschädigt. In Schüttelkulturen wäre die Sauerstoffversorgung zwar besser, aber sie schalten den körperlichen Kontakt zwischen Pilz und Pflanzenwurzeln aus.

Aufzucht der Pilze: Die Pilze wuchsen auf Bierwürzeagar. Alle 14 Tage wurde ihr Nährboden erneuert. Damit die Pilze physiologisch aktiv bleiben, wurden sie jeweils nach zwei Monaten zwei Wochen lang auf Tomatenagar kultiviert. Tomatensaft führt ihnen viele Nähr- und Spurenelemente zu, die der Bierwürze fehlen. Für die Versuche verwendete ich Sporensuspensionen. Auf Kolleschalen bildeten die Pilze bei 25 °C genügend Sporen.

Die beiden *Penicillium*-Arten hatten schon nach drei Wochen einen dichten Sporenrasen, während es bei *Aspergillus terreus* ein bis zwei Wochen länger dauerte. Mit einer 0,1prozentigen Tween-80-Lösung wurden die Sporen aus den Kolleschalen gespült und pro Kolben zwei Tropfen geimpft.

Aufzucht der höheren Pflanzen: Pflanzen, deren Entwicklung unter verschiedenen Einflüssen miteinander verglichen wird, sollten unter denselben Bedingungen gleichmässig wachsen. Ich las daher intakte Samen gleicher Grösse aus.

Die sterile Aufzucht geschah nach der Methode von Burlet (1940). Bei Mais wird der Fruchtstiel, der häufig mit *Fusarium* infiziert ist, mit einer spitzen, kleinen Flamme abgebrannt. Die Haferkörner werden entspelzt. Um den gröbsten Schmutz zu entfernen, werden die Körner fünf Minuten in fliessendem Wasser vorgereinigt, dann fünf Minuten in Seifenwasser geschüttelt und eine Viertelstunde lang gespült. Die Samen werden in einer Bromlösung desinfiziert. Die geeignete Bromkonzentration und die optimale Einwirkungsdauer sind von Pflanze zu Pflanze verschieden. Maiskaryopsen vertragen mit ihrer derben Fruchtschale relativ hohe Konzentrationen und lange Einlegezeiten, während die Haferkörner sehr empfindlich gegenüber Brom sind. Damit das Desinfektionsmittel ihre behaarte Oberfläche besser benetzen kann, müssen die Haferkörner vorher mit einer 0,1prozentigen Tween-80-Lösung gespült werden. Es wurden folgende Anwendungszeiten und Bromkonzentrationen verwendet:

Mais zwei Stunden in Bromwasser 1:500 (Bürgin-Wolff, 1959),
Erbsen zwanzig Minuten in Bromwasser 1:900,
Hafer zwei Minuten in Bromwasser 1:4000 (Martin, 1957).

Die Samen wurden anschliessend im Quellapparat von Burlet (1940) 24 Stunden gequollen. Für die kleinen Haferkörner verwendete ich ein Drahtkörbchen, das gerade in das Quellrohr hineinpasst. Mais und Erbsen wuchsen zuerst auf Keimröhrchen, Mais vier Tage bei 28 °C und die Erbsen fünf Tage bei 25 °C. Hafer keimte bei 24 °C auf zwei Lagen Filterpapier in sterilen Petrischalen (Martin, 1957). Wenn die Keimpflanzen auf Fernbachkolben gesetzt werden, müssen ihre Wurzeln mindestens so lang sein, dass die Spitzen in die Nährlösung eintauchen.

Allen Versuchspflanzen wurde eine Vorkultur von einer Woche gewährt. In dieser Zeit entwickeln die Pflanzen die ersten Laubblätter und ein Wurzelsystem. Keimpflanzen auf dieser Entwicklungsstufe können mit den Pilzen konkurrieren, während noch etiolierte Keimlinge, die erst die Keimwurzel ausgebildet haben, durch die Pilze zugrunde gerichtet werden. Frei (1963) hat festgestellt, dass die Dauer der Vorkultur von Mais die Wechselwirkungen zwischen Mais und Pilzen in Mischkultur beeinflusst. Die Vorkulturen standen immer unter denselben klimatischen Verhältnissen im Gewächshaus. Die Pflanzen wuchsen im 14-Stunden-Tag bei etwa 24 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80–100 %.

Für die Mischkultur ersetzte ich die Nährlösung durch eine frische mit Zucker, die ich mit dem entsprechenden Pilz beimpfte. Die sterilen Kontrollpflanzen erhielten ebenfalls eine neue Nährlösung.

Nach sieben Tagen Mischkultur brach ich die Versuche ab. In dieser Zeit entwickeln sich die Pilze soweit, dass sie die höhere Pflanze beeinflussen können. Auch bilden sie nachweisbare Mengen von Antibiotika. Nach einer Woche sind beide Partner der Mischkultur noch lebensfähig. Wenn die Versuche nicht unter besonderen ökologischen Bedingungen durchgeführt wurden, standen sie im gleichen Klima wie die Vorkulturen. Als Zusatzbeleuchtung dienten Neonlampen mit ähnlicher Strahlung wie Tageslicht.

Auswertung der Versuche

Nach sieben Tagen Mischkultur wurden die Versuche abgebrochen. Wurzeln, Spross und Samenreste beziehungsweise Reste der Karyopsen jeder Pflanze wurden einzeln aufgearbeitet. Es war nicht schwer, die Pilze, die auf der Oberfläche der Kulturlösung nur eine geschlossene Myzeldecke ausbildeten, von den Wurzeln zu trennen. Die Scheiden, die *Penicillium citrinum* um die Hauptwurzel von Mais bildete, liessen sich mit einer feinen Pinzette wie ein Handschuh vom Finger streifen. Jede Pilzkultur wurde einzeln verarbeitet. Diese Methode ist zwar aufwendig, aber man gewinnt damit einen besseren Einblick in das Verhältnis der einzelnen Pflanzen zu ihren Pilzpartnern, als wenn man Mittelwerte miteinander vergleicht. Die Pilze wurden auf aschefreies Filterpapier abgenutscht. Mit destilliertem Wasser wurden sorgfältig Reste der Kulturlösung von Wurzeln und Myzelien in die Kolben zurückgespült. Ich mass die Länge von Wurzeln und Sprossen und bestimmte das Trockengewicht dieser Organe und der Pilze. Getrocknet wurde bei 105 °C.

Da ich nur das *Gewicht* der Asche bestimmte, genügte eine trockene Veraschung (Paech und Tracey, 1956). Man zerkleinert das getrocknete Pflanzenmaterial und füllt es in Porzellantiegel ab. Verascht wird in einem Muffelofen bei 500 °C. Die Temperatur darf nur langsam gesteigert werden, da sonst die Aschenprobe aussen verkrustet und so Kohlenstoffteilchen einschliesst. Die letzten Reste organischen Materials werden durch konzentrierte Salpetersäure entfernt. Pro Tiegel wird 1 ml HNO_3 zugegeben, die Lösung zur Trockne eingedampft und eine Stunde auf 500 °C erhitzt. Wenn die Proben miteinander verglichen werden sollen, müssen alle gleich behandelt werden. Darum unterzog ich alle, auch die, deren Asche weiss war, der Nachoxydation mit Salpetersäure. Obwohl durch das nachträgliche Erhitzen die Nitrate wieder in Oxyde überführt werden, treten erhebliche Gewichtsdifferenzen zwischen behandelten und unbehandelten Proben auf. Bevor die Tiegel gewogen werden, kühlt man sie vier Stunden im Exsikkator aus. Man muss diese Zeit bei allen Proben genau einhalten. Es entstehen sonst Gewichtsunterschiede, da die stark hygroskopische Asche, trotz aller Vorsicht, doch etwas Wasser anzieht.

Nachweis der Antibiotika: Antibiotika kann man biologisch und chemisch nachweisen. Mit biologischen Methoden prüft man, ob in einem Kultursubstrat überhaupt antibiotische Substanzen vorhanden sind. Kennt man das Antibiotikum, so kann man es aus dem Kultursubstrat isolieren und wägen. Die Antibiotika meiner Pilze sind bekannt. Mit dem Oxfordtest wurde geprüft, ob und wann die Pilze einzeln und in Mischkultur ihr Antibiotikum produzieren; um die Mengen zu ermitteln, wurde die antibiotische Substanz isoliert und gewogen.

Zum biologischen Nachweis der Antibiotika führte ich den Oxfordtest durch. Als Testorganismus diente *Bacillus subtilis*, der keine grossen Ansprüche stellt und nicht pathogen ist. Pro Petrischale wurden 20 ml Bierwürzeagar (2,5 % Agar) verwendet, der vor dem Ausgiessen mit einer Öse voll *Bacillus subtilis* beimpft worden war. Die Bakterien wurden durch rasches Drehen der Kulturröhrchen zwischen den Händen im flüssigen Agar gleichmässig verteilt. Je zwei Tropfen der zu prüfenden Kulturlösung wurden in ausgestanzte Löcher des Agars verteilt und die Kulturen 24 Stunden bei 28 °C bebrütet.

Citrinin wurde aus der Kulturlösung isoliert und gewogen. Da mit den verwendeten Nährlösungen pro Liter im Durchschnitt nur etwa 10–20 mg Citrinin gebildet werden, eignete sich die Methode von Hetherington und Raistrick (1931) nicht. Ich modifizierte sie daher: Die Kulturlösung wird bis auf das Zehnfache eingeengt und anschliessend mit konzentrierter HCl angesäuert, da Citrinin als schwache Säure alkalilöslich ist. Das Antibiotikum wird mit Chloroform extrahiert und diese Lösung zur Trockne eingedampft; durch Sublimation bei 90 °C und 0,5 mm Hg wurde das Citrinin von den Resten des Lösungsmittels und der Verunreinigungen getrennt. Da die Ausbeute an Citrinin unter den Bedingungen der Mischkultur gering war, gelang dies allerdings nicht völlig, wie der Schmelzpunkt von etwa 160 °C der gewonnenen, gelben Citrininkristalle gegenüber dem für reinstes Citrinin angegebenen (175 °C, Rauen, 1964, S. 468) zeigt.

Statistik: Pro Bedingung wählte ich zehn Kolben; jede Kultur wurde einzeln gemessen. Alle Versuche wurden zwei- bis dreimal durchgeführt. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten für die einzelnen Versuchsbedingungen wurden mit dem *t*-Test geprüft; Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0{,}01$ betrachtete ich als signifikant. Die Temperaturversuche wurden zusätzlich mit dem *F*-Test geprüft (im hiesigen Rechnungszentrum mit IBM 1620).

Versuche

Die Wechselwirkung zwischen einer höheren Pflanze und einem bestimmten Pilz ist bis jetzt nur wenig untersucht worden (Vöchting, 1953; Frei, 1963); die beiden Autoren haben sich mit der Konkurrenz um Ionen befasst. Melin (1954), Sadovskaya (1959) und Turner (1963) haben in höheren Pflanzen Substanzen gefunden, die das Wachstum gewisser Mikroorganismen hemmen oder fördern. Björkman (1942) hat einen ökologischen Faktor, das Licht, als massgebend für die Beziehung zwischen *Picea abies* und ihrem Mykorrhizapilz erachtet. Vermehrter Lichtgenuss erhöht die Photosynthese der grünen Pflanze; sie scheidet mehr Kohlehydrate durch die Wurzel aus, die den Bodenpilzen zugute kommen. Man kennt aber sonst noch kaum Ursachen der gegenseitigen Beeinflussung von höheren Pflanzen und Mikroorganismen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob verschiedene Pilze die Entwicklung einiger höherer Pflanzen beeinflussen; zudem setzte ich mich mit dem Problem auseinander, wie die grüne Pflanze auf das Wachstum und die Lebenstätigkeit, zum Beispiel Antibiotikumproduktion, des Pilzpartners einwirkt. Dann ist es interessant, zu erfahren, ob sich ein Organismus, Pilz oder höhere Pflanze, gegenüber verschiedenen Partnern verschieden verhält und ob ökologische Faktoren in das Verhältnis zwischen Pilz und grüner Pflanze hineinspielen.

Alle Pilze zeigten in Mischkultur mit den verschiedenen höhern Pflanzen ein ähnliches Wachstumsbild. Sie bilden zuerst einzelne Kolonien, von denen einige nach ein paar Tagen zu einer geschlossenen Decke zusammenschliessen. Am besten wachsen die Pilze in Wurzelnähe; ihr Myzel umschliesst Haupt- und Seitenwurzeln, so dass diese auf der Wasseroberfläche treiben. Die Pilzdecke ist mit einem Schwimmfloss zu vergleichen, in dessen Unterseite die Wurzeln eingebettet sind. Die Wurzeln der sterilen Pflanzen tauchen dagegen tief in die Nährlösung ein. Die Pilze hindern vielleicht auf diese Weise rein mechanisch die Wasser- und Ionenaufnahme der höheren Pflanzen (siehe hiezu aber Frei, 1963, S. 43 ff.). Es wäre auch interessant, zu wissen, ob die Pilze im Boden eventuell wasserführende Kapillaren verstopfen.

Zea Mays in Mischkultur mit Penicillium citrinum, Penicillium patulum und Aspergillus terreus

Penicillium citrinum hindert die Maiskaryopsen am Auskeimen. Für diese Versuche wurde der Pilz in die Keimröhrchen geimpft. Das Wachstum der Keimpflanzen, das heisst ihre Längen- und Gewichtszunahme, wird von allen Pilzen gehemmt. Dagegen beeinflussen die Pilze die Ionenaufnahme der Keimpflanzen aus den Körnern nicht. Der Vergleich des Aschengehaltes von unausgekeimten Körnern und solchen von Keimpflanzen zeigt, dass etwa zwei Drittel ihres Ionengehaltes von der jungen Pflanze aufgenommen werden, was auch Pedretti (1958) beobachtete.

Tabelle 1

Zea Mays: Einfluss auf die Entwicklung der Pilze. Vorkultur des Maises 7 Tage. Pfeffer-Robbins-Nährlösung mit 0,5 % Glukose. Durchschnitt aus 10 Kolben

Pilze	mg Trockengewicht			mg Asche		
	einzeln	mit *Zea Mays*	Effekt	einzeln	mit *Zea Mays*	Effekt
Penicillium citrinum	139 ± 1	88 ± 5	—37 %	27 ± 3	17 ± 3	—37 %
Penicillium patulum	122 ± 5	197 ± 6	+61 %	10 ± 0,8	14 ± 0,8	+40 %
Aspergillus terreus	100 ± 4	167 ± 6	+67 %	7 ± 0,4	11 ± 1	+57 %

Mais wirkt nicht auf alle Pilze gleich. Das Wachstum beziehungsweise die Gewichtszunahme von *Penicillium citrinum* wird gehemmt, während jene von *Penicillium patulum* und *Aspergillus terreus* gefördert wird (Tab. 1). Die Kulturen wuchsen im Gewächshaus auf Pfeffer-Robbins-Nährlösung mit Glukose. Nach sieben Tagen wurde das

Trocken- und Aschengewicht der Pilze ermittelt. In Einzelkultur wachsen *Penicillium patulum* und *Aspergillus terreus* in dieser Nährlösung nicht gerade gut. Mais scheidet offenbar kleine Mengen von Kohlehydraten, Aminosäuren oder Wirkstoffen aus, die genügen, dass das Gewicht beider Pilze gegenüber den spärlich gedeihenden Kontrollen um über 60% gesteigert wird.

Es ist aufschlussreich, zu wissen, ob Mais nicht nur das Wachstum der Pilze beeinflusst, sondern auch in ihren speziellen Stoffwechsel eingreift. Ich habe deshalb eine leicht zu beobachtende Reaktion der Pilze, ihre Antibiotikumproduktion, untersucht. Es war nicht schwer, Citrinin quantitativ zu bestimmen. Sobald der Oxfordtest ein positives Resultat zeigte, wurde der Versuch abgebrochen, das Antibiotikum isoliert und das Trockengewicht des Pilzes bestimmt. Die Citrininmenge wird auf 1 g Trokkengewicht bezogen. Um den zeitlichen Verlauf der Antibiotikumbildung zu verfolgen, wurden Versuche nach 4, 6 und 7 Tagen Kulturdauer aufgearbeitet (Abb. 1). Da ich Patulin nicht aus der Kulturlösung isolieren konnte, stelle ich die Mengen dieses Antibiotikums durch die Hemmzonen im Oxfordtest dar (Abb. 2). Die Testserien wurden mehrmals wiederholt; ihre Mittelwerte streuten bis 5%.

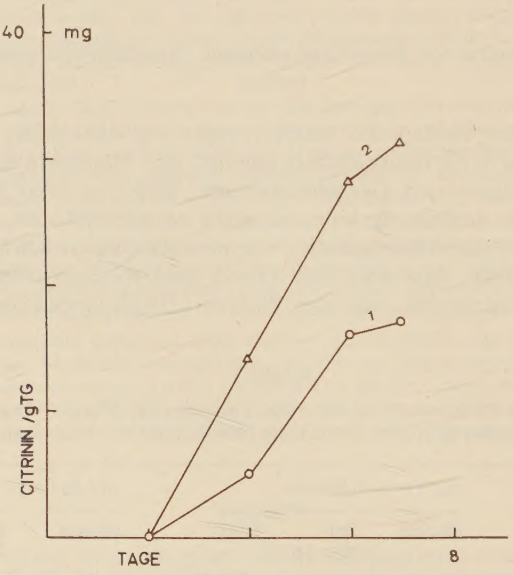

Abbildung 1

Einfluss von *Zea Mays* auf die Citrininbildung durch *Penicillium citrinum*. Vorkultur, Mais 7 Tage; Mischkultur 7 Tage. Glukose 0,5%. 1 Einzelkultur, 2 Mischkultur. TG Trockengewicht des Pilzes

Aspergillus bildet unter den angewandten Kulturbedingungen kein Citrinin, weder in Einzel- noch in Mischkultur mit Mais. Jeder von Pollock (1947) untersuchte Pilz bedarf eines andern Nährbodens für die Citrininproduktion. Auch spielt der Zuckergehalt der Nährlösung eine Rolle (Hetherington und Raistrick, 1931). Interes-

sant verhält sich *Penicillium citrinum;* es produziert in Mischkultur mit Mais mehr Citrinin als in Einzelkultur (Abb. 1). *Penicillium patulum* bildet nur in Mischkultur Patulin. Mais fördert das Wachstum dieses Pilzes so stark, dass er nachweisbare Mengen von Antibiotikum ausscheiden kann.

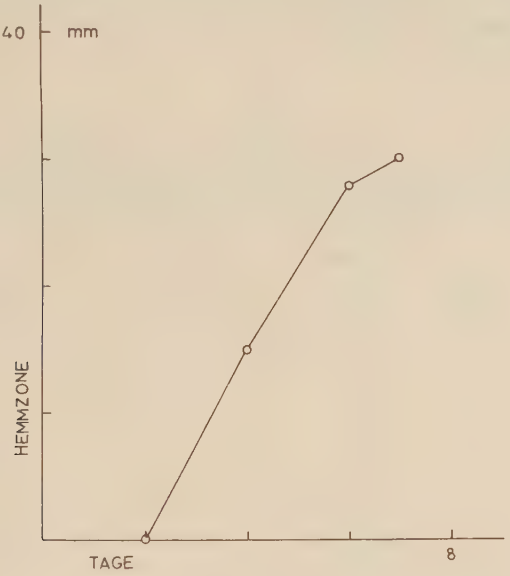

Abbildung 2

Einfluss von *Zea Mays* auf die Antibiotikumproduktion von *Penicillium patulum* in Mischkultur. Vorkultur, Mais 7 Tage. Knop-Nährlösung mit 0,5% Glukose. Oxfordtest: Mittelwerte aus 3 Versuchen zu 10 Kolben; Streuung 5%. Kurve: Mischkultur (in Einzelkultur bildet der Pilz keine nachweisbaren Mengen an Antibiotikum)

An Mischkulturen von *Zea Mays* mit *Penicillium citrinum* wurde untersucht, wie ökologische Bedingungen das «Gleichgewicht» zwischen einer höheren Pflanze und einem Pilz beeinflussen. Misch- und Einzelkulturen der beiden Partner wurden bei verschiedenen Tageslängen sowie veränderter Temperatur, Wasserstoff- und Ionenkonzentration der Nährlösung gezogen.

Einfluss der Nährlösungstemperatur

Mit der Frage, wie die Bodentemperatur auf die Beziehungen zwischen höheren Pflanzen und Mikroorganismen wirkt, haben sich einige Autoren beschäftigt. Lloyd und Lockwood (1963) haben festgestellt, dass *Thielaviopsis*, ein parasitischer Pilz, Erbsenwurzeln nur bei einer für die Erbsen ungünstigen Bodentemperatur befällt. Es ist gleichgültig, ob diese Temperatur für den betreffenden Pilz optimal ist oder nicht. An Erdbeeren haben Husain und McKeen (1963) beobachtet, dass deren Wurzeln

bei tiefen Temperaturen von *Rhizoctonia fragariae* stärker befallen werden als in warmem Boden. Die Autoren meinen, dass die Erdbeerwurzeln in kaltem Boden vermehrt Stoffe ausscheiden, die das Pilzwachstum begünstigen.

Für meine Versuche stellte ich die Kulturkolben in Wasserbäder mit der gewünschten Temperatur. Ich wählte Temperaturen von 25 °C und 35 °C. Mais und Pilz wachsen einzeln und in gemeinsamer Kultur normal, doch unterscheiden sie sich bei diesen beiden Temperaturen deutlich.

Tabelle 2

Einfluss der Temperatur auf *Zea Mays* in Einzelkultur. Am Ende der Vorkultur wurden die Kulturkolben in die Temperaturbäder gestellt. Dauer der Vorkultur 7 Tage, Dauer der Kultur in konstant temperierter Nährlösung 7 Tage. Lufttemperatur etwa 20 °C, Luftfeuchtigkeit 80 %. Tageslänge 14 Stunden. Mittelwerte aus 10 Pflanzen

Temperatur	Länge in cm		Gewicht in mg	
	Spross	Wurzel	Trockengewicht	Asche
25 °C	30 ± 2	43 ± 1	118 ± 2	25 ± 1
35 °C	38 + 1	50 ± 3	181 ± 9	39 ± 4
Förderung durch höhere Temperatur	27 %	16 %	53 %	56 %

Mais wird bei 35 °C im Längenwachstum von Wurzel und Spross sowie im Trokken- und Aschengewicht gegenüber 25 °C signifikant gefördert (Tab. 2). Gerade umgekehrt verhält sich *Penicillium citrinum*. Er entwickelt sich bei der höheren Temperatur deutlich schlechter als bei 25 °C (Tab. 3). Auch bildet der Pilz bei 35 °C kein Citrinin in Einzelkultur (Abb. 3).

Tabelle 3

Einfluss der Temperatur auf *Penicillium citrinum* in Einzelkultur. Pfeffer-Robbins-Nährlösung mit 0,5 % Glukose. Dauer der Kultur in Temperaturbädern 7 Tage. Impfung mit Sporensuspension. Mittelwerte aus 10 Kolben. TG = Trockengewicht des Pilzes

Temperatur	Gewicht in mg		Citriningehalt nach 7 Tagen (mg/g TG)
	TG	Asche	
25 °C	202 ± 7	27 ± 1	7 ± 1
35 °C	124 ± 2	20 ± 2	0
Hemmung durch höhere Temperatur	39 %	26 %	100 %

Ganz anders verhalten sich die beiden Partner in gemeinsamer Kultur (Tab. 4 und 5). Mais und Pilz hemmen einander bei 35 °C stärker als bei 25 °C. Besonders *Penicillium citrinum* wird bei der höheren Temperatur stark beeinträchtigt. Für Mais bedeutet eine Substrattemperatur von 35 °C eine Wende. Oberhalb dieser Temperatur wird er im Wachstum und in der Stoffaufnahme gehemmt (Läuchli, 1966).

Es ist schwer zu deuten, wieso sich die Mischkulturen bei diesen Temperaturen so verhalten. Mais wächst in Einzelkultur bei 35 °C besser, doch wird er in Mischkultur bei dieser Temperatur stärker gehemmt und vermag doch den Pilz noch mehr zu beeinträchtigen als bei 25 °C. Leichter zu erklären ist das Verhalten von *Penicillium citrinum*. Er wächst in Einzelkultur bei 35 °C schlechter. (Im allgemeinen liegt das Temperaturoptimum für Arten von *Penicillium* bei etwa 20 °C.) Bei dieser Temperatur wird er auch durch Mais stärker gehemmt als bei 25 °C. Der für den Pilz ungünstige ökologische Faktor vermindert also seine Konkurrenzfähigkeit gegenüber Mais.

Tabelle 4

Zea Mays und *Penicillium citrinum* in Mischkultur. Hemmung von Mais durch den Pilz bei verschiedenen Temperaturen. Vorkultur des Maises 7 Tage; Mischkultur 7 Tage in Wasserbädern konstanter Temperatur. Lufttemperatur etwa 20 °C. Tageslänge 14 Stunden. Mittelwerte aus 10 Kulturen pro Temperatur

	25 °C			35 °C		
	einzeln	mit Pilz	Effekt	einzeln	mit Pilz	Effekt
Sprosslänge in cm	30±0,5	27±0,5	—10 %	38±1	28±1	—26 %
Wurzellänge in cm	43±2	36±1	—16 %	50±3	35±3	—30 %
Trockengewicht in mg	118±2	96±3	—19 %	181±9	107±8	—41 %
Asche in mg	25±1	19±3	—24 %	39±4	16±4	—59 %

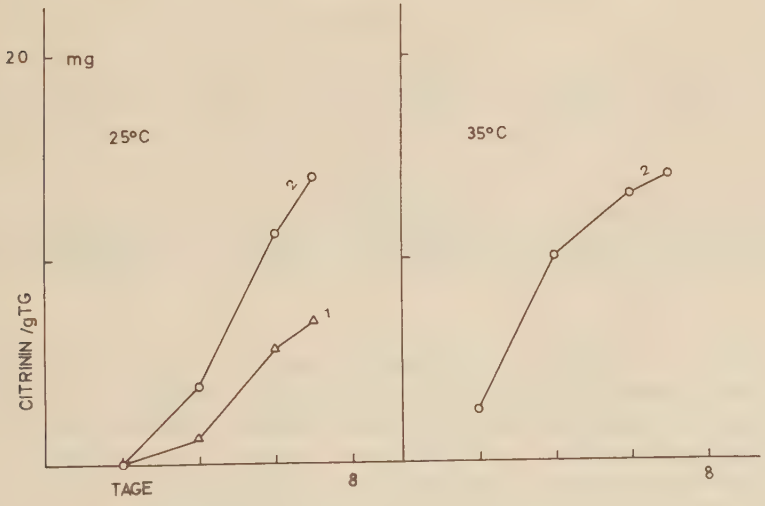

Abbildung 3

Einfluss von *Zea Mays* auf die Citrininproduktion von *Penicillium citrinum* bei verschiedenen Temperaturen. Vorkultur, Mais 7 Tage; Mischkultur 7 Tage. Glukose 0,5 %. 1 Einzelkultur, 2 Mischkultur. TG Trockengewicht des Pilzes. Bei 35 °C bildet der Pilz in Einzelkultur keine nachweisbaren Mengen an Antibiotikum

Tabelle 5

Penicillium citrinum und *Zea Mays* in Mischkultur. Hemmung des Pilzes durch Mais bei verschiedenen Nährlösungstemperaturen. Vorkultur des Maises 7 Tage: Mischkultur 7 Tage in Wasserbädern konstanter Temperatur. Mittelwerte aus 10 Kulturen pro Temperatur

Temperatur	Trockengewicht in mg			Asche in mg		
	einzeln	mit Mais	Effekt	einzeln	mit Mais	Effekt
25 °C	202 ± 7	174 ± 8	—14 %	27 ± 1	22 ± 1	—19 %
35 °C	124 ± 2	41 ± 12	—67 %	20 ± 4	8 ± 2	—60 %

Betrachtet man die Citrininbildung, so erscheint das Verhältnis von Pilz und Mais klarer. Obwohl *Penicillium citrinum* bei 35 °C stärker gehemmt wird, vermag er in Mischkultur gleichviel Citrinin zu bilden wie bei der tieferen Temperatur. Den Verlauf der Konkurrenz zwischen Mais und Pilz kann man sich so vorstellen: Mais, der etwa bei 22 °C vorkultiviert worden ist, wird bei 35 °C stärker zum Wachsen angeregt als bei 25 °C. Mais scheidet wahrscheinlich in dieser Zeit Stoffe aus, die die Citrininproduktion des Pilzes ermöglichen. Nach vier Tagen Mischkultur beginnt *Penicillium citrinum* sein Antibiotikum zu bilden. 35 °C ist offenbar für Mais eine kritische Temperaturschwelle, an der die gleiche Citrininmenge ihn stärker zu hemmen vermag als bei 25 °C. Dass Citrinin Mais hemmt, haben auch Seiler (1951) und Frei (1963) beobachtet. *Penicillium citrinum* gleicht also den günstigen Einfluss der höheren Temperatur wieder aus.

Einfluss der Tageslänge

Auch das Licht spielt in das Gleichgewicht zwischen höheren Pflanzen und Mikroorganismen hinein. Einige Autoren haben sich damit befasst, wie das Licht auf die Mykorrhiza wirkt (Björkman, 1942; Harley und Waid, 1956). Mykorrhizapilze wachsen am besten mit Pflanzen, die optimale Belichtung geniessen. Björkman (1942) führt das darauf zurück, dass diese Pflanzen infolge gesteigerter Photosynthese vermehrt Kohlehydrate durch die Wurzeln ausscheiden, die den Pilzen zugute kommen. Rovira (1959) hat festgestellt, dass die Bakterienzahl in der Rhizosphäre von Tomaten um 60 % abnimmt, wenn die Pflanzen nur noch in den Genuss von 40 % des vollen Sonnenlichts kommen.

In meinen Versuchen habe ich den Maissprossen in der Vorkultur eine tägliche Belichtung von vierzehn Stunden geboten; die Kolben mit den Wurzeln und dem Pilz blieben verdunkelt. Je zehn Pflanzen wurden dann während der Mischkultur einem 7-, 14- und 21-Stunden-Tag ausgesetzt; *Penicillium citrinum* wuchs im Dunkeln.

Um auszusagen, wie sich das Gleichgewicht zwischen Mais und Pilz bei verschiedener Tageslänge verschiebt, ist es nötig, das Verhalten von Mais in Einzelkultur zu kennen. Tabelle 6 zeigt, dass Mais im 14- und 21-Stunden-Tag ein signifikant höheres Trockengewicht aufweist als im Kurztag. Die Wurzeln unterscheiden sich nicht in den verschiedenen Tageslängen. Die Sprosse etiolieren im 7-Stunden-Tag ein wenig. Schüepp und Chang (1938) haben das gleiche an Senfpflanzen beobachtet. Die Pflanzen, die im Kurztag wuchsen, zeigten längere Internodien als die im Langtag.

Tabelle 6

Zea Mays: Einfluss der Tageslänge auf die Entwicklung. Vorkultur 7 Tage im 14-Stunden-Tag. Wachstum bei verschiedenen Tageslängen 7 Tage. Mittelwerte aus je 10 Pflanzen

Tageslänge	Länge in cm		Gewicht in mg	
	Spross	Wurzel	Trockengewicht	Asche
7 h	50±3	30±1	103±4	25±1
14 h	31±1	34±2	139±4	31±1
21 h	28±3	32±2	135±2	28±2

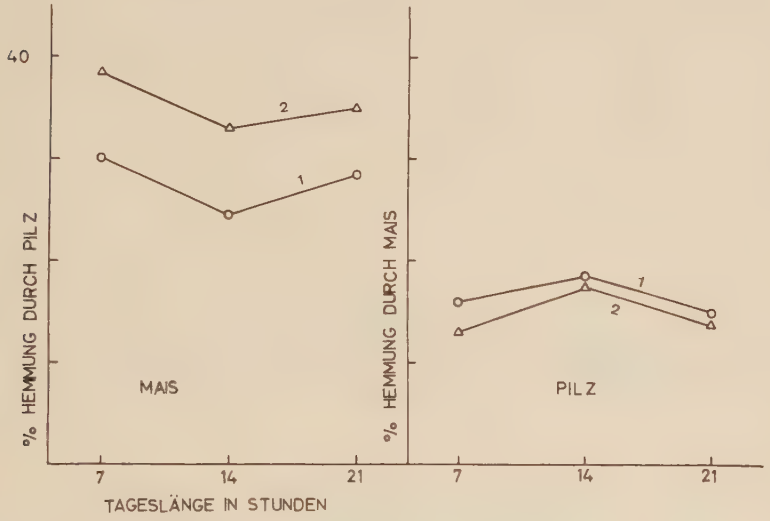

Abbildung 4

Zea Mays und *Penicillium citrinum* in Mischkultur. Einfluss der Tageslänge auf die gegenseitige Hemmung. Vorkultur, Mais 7 Tage im 14-Stunden-Tag; Mischkultur 7 Tage; je 10 Kulturen in derselben Tageslänge. 1 Trockengewicht, 2 Aschengewicht. Wurzelsystem + Pilz und Pilz allein verdunkelt

Aus Abbildung 4 ist zu ersehen, wie sich Mais und *Penicillium citrinum* bei verschiedenen Tageslängen in Mischkultur verhalten. Der Pilz beeinflusst das Längenwachstum von Wurzel und Spross nicht. Hingegen zeigen Pflanzen in Mischkultur gegenüber den Kontrollen ein deutlich geringeres Trocken- und Aschengewicht. Mais wird im 7- und 21-Stunden-Tag am stärksten gehemmt. *Penicillium citrinum* wird im 14-Stunden-Tag am meisten beeinträchtigt. Diese Tageslänge ist für Mais optimal; er vermag daher mit dem Pilz am besten zu konkurrieren.

Abbildung 5 zeigt, wie die Tageslänge indirekt bestimmt, wieviel Citrinin *Penicillium citrinum* bildet. In allen Tageslängen scheidet der Pilz in Gesellschaft mit Mais mehr Citrinin aus als in Einzelkultur. Im 21-Stunden-Tag wird am meisten Anti-

biotikum produziert. In diesem Langtag assimiliert Mais wahrscheinlich so viel, dass er vermehrt organische Stoffe in die Nährlösung abgeben kann, was zu einer vermehrten Bildung von Citrinin führt.

Abbildung 5

Penicillium citrinum in Mischkultur mit *Zea Mays*. Einfluss der photoperiodischen Reaktion des Maises auf die Citrininbildung des Pilzes. Vorkultur, Mais 7 Tage; Citrininbestimmung nach 7 Tagen Mischkultur (Pilz wuchs im Dunkeln). Glukose 0,5%. 1 Einzelkultur des Pilzes, 2 Mischkultur. TG Trockengewicht des Pilzes

Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration

Die Wasserstoffionenkonzentration des Bodens beeinflusst die Beziehungen zwischen höheren Pflanzen und Mikroorganismen. Die Reaktion des Bodens wählt, hemmt oder begünstigt die Mikroben des Wurzelhorizontes. Mit den Wurzeln von *Allium porrum* L. sind in sauren Böden andere Pilze vergesellschaftet als in alkalischem Milieu (Parkinson und Clarke, 1961). *Fusarium culmorum* vermag Weizen auf leicht alkalischem Ton nicht zu schädigen (Samuel und Greaney, 1938). Mais ermöglicht vielen Mikroorganismen das Leben in seinem Wurzelbereich, da er saure und alkalische Böden neutralisiert (Thom und Humfeld, 1932).

Meine Versuche sollen aufklären, wie sich das Verhältnis zwischen einer höheren Pflanze und einem bestimmten Pilz bei verschiedener Reaktion der Nährlösung ändert. Ich wählte wieder *Zea Mays* und *Penicillium citrinum* als Partner. Je zehn Kulturen wurden sieben Tage bei konstanten pH-Werten von 2, 4 und 6 gehalten. Mais wurde eine Woche lang bei pH 4 vorkultiviert. Die Entwicklung von Pilz und Mais in Mischkultur wurde verglichen mit Einzelkulturen bei den entsprechenden pH-Werten. Die gewünschte Reaktion wurde jeden Tag überprüft und wenn nötig mit steriler H_2SO_4 oder NaOH wieder eingestellt.

Tabelle 7

Zea Mays: Einfluss des pH auf die Entwicklung in Pfeffer-Robbins-Nährlösung. Vorkultur 7 Tage bei pH 4; Kultur bei konstantem pH 7 Tage. Temperatur etwa 20 °C. Tageslänge 14 Stunden. Je 10 Pflanzen

pH	Länge in cm		Gewicht in mg	
	Spross	Wurzel	Trockengewicht	Asche
2	29±1	34±1	106±3	14±1
4	41±1	56±2	196±5	37±3
6	36±1	51±3	103±3	19±1

Aus Tabelle 7 sieht man, wie sich Mais in Einzelkultur verhält. Die Pflanzen entwickeln sich bei pH 4 am besten. Die Wurzeln wachsen bei pH 4 und 6 gleich stark in die Länge. Ausser dem Trockengewicht, das bei pH 2 und 6 nicht verschieden ist, zeigt Mais in der stark sauren Nährlösung geringstes Längenwachstum und Aschengewicht.

Tabelle 8

Penicillium citrinum: Einfluss des pH auf die Entwicklung in Pfeffer-Robbins-Nährlösung mit 0,5% Glukose. Kulturdauer: 7 Tage bei konstantem pH. Temperatur etwa 24 °C. Mittelwerte aus je 10 Kolben

pH	Gewicht in mg		mg Citrinin pro g Trockengewicht
	Trockengewicht	Asche	
2	139±1	6±1	9±1
4	162±4	27±3	17±1
6	149±1	9±1	13±1

Tabelle 8 lässt erkennen, dass *Penicillium citrinum* bei pH 4 am besten wächst und am meisten Citrinin pro g Trockengewicht produziert. Udagawa, Hashimoto und Hirayama (1956) haben zwar festgestellt, dass verschiedene Stämme von *Penicillium citrinum* ihr Antibiotikum unabhängig vom pH des Nährbodens bilden. Doch meine Versuchsbedingungen sind so, dass der Pilz gerade noch Citrinin bilden kann. Die Reaktion der Nährlösung vermag daher dieses labile Verhalten zu beeinflussen.

In Abbildung 6 ist dargestellt, wie stark sich Mais und Pilz bei verschiedenem pH der Nährlosung gegenseitig hemmen. Mais wird bei pH 2 am meisten beeinträchtigt. Bei pH 6 wird er von *Penicillium citrinum* nicht mehr signifikant beeinflusst. Nur die Wurzeln sind in Mischkultur kürzer. Einzel- und Mischkulturen von Mais haben nicht dasselbe optimale pH.

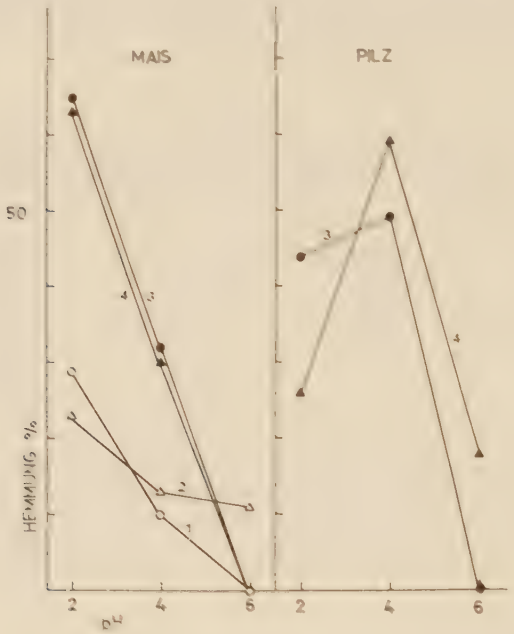

Abbildung 6

Zea Mays und *Penicillium citrinum* in Mischkultur. Gegenseitige Hemmung bei verschiedenen pH-Werten der Nährlosung. Vorkultur, Mais 7 Tage, Mischkultur 7 Tage. 1 Sprosslänge, 2 Wurzellänge, 3 Trockengewicht, 4 Asche

Bei pH 4 wachsen Einzelkulturen von *Penicillium citrinum* am besten; doch wird der Pilz bei diesem pH von Mais am stärksten gehemmt (Abb. 6). Dieses Ergebnis scheint widersinnig; aber es lässt sich erklären. In der sauren Nährlösung (pH 2) wächst Mais so schlecht, dass er den Pilz nicht so stark beeinträchtigen kann. Und bei pH 6 hemmen beide Partner einander kaum, obwohl dieses pH weder für Pilz noch Mais in Einzelkultur optimal ist. Diese Resultate zeigen, dass Mais und *Penicillium citrinum* in gemeinsamer Kultur ganz anders auf eine Umweltbedingung reagieren, als wenn sie einzeln wachsen.

In Mischkultur wird bei allen pH-Werten mehr Citrinin gebildet als in Einzelkultur (Abb. 7). Am meisten Citrinin entsteht bei pH 4. In diesem Milieu wird der Pilz am stärksten gehemmt. Mais wird nicht proportional der Citrininmenge beeinträchtigt (Abb. 6). Um Mais zu hemmen, genügt in einem für ihn ungünstigen, hier stark sauren Milieu weniger Antibiotikum als unter ihm geeigneteren Bedingungen.

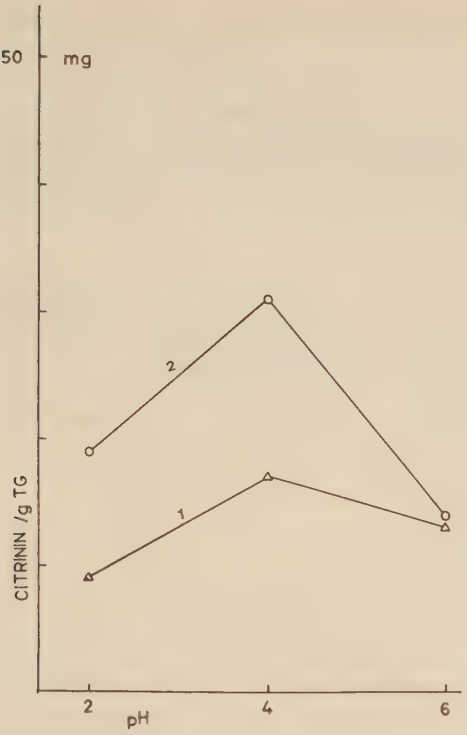

Abbildung 7

Citrininbildung durch *Penicillium citrinum* in Einzel- und Mischkultur mit *Zea Mays* bei verschiedenen pH-Werten. Vorkultur, Mais 7 Tage; Citrininbestimmung nach 7 Tagen Kultur. Glukose 0,5%. TG Trockengewicht des Pilzes. 1 Einzelkultur des Pilzes, 2 Mischkultur

Einfluss der Konzentration an Nährionen

Viele Autoren untersuchten, wie Bodenmikroorganismen auf die Ernährung höherer Pflanzen einwirken. Die Mikroflora der Rhizosphäre kann um Nährionen konkurrieren (Krüger und Schneidewind, 1901; Akhromeiko und Shestakova, 1958). Mikroben vermögen auch die Aufnahme von Spurenelementen zu erschweren (Gerretsen, 1937; Barker und Broyer, 1942; Vöchting, 1953, und Frei, 1963). Hingegen verändern Mikroorganismen schwer lösliche Phosphatverbindungen so, dass die höheren Pflanzen das Phosphat aufnehmen können (Gerretsen, 1948; Krasil'nikov und Kotelev, 1959; Gerdemann, 1965).

In meinen Versuchen wurde Mais und *Penicillium citrinum* einzeln und gemeinsam in vierfach verdünnter Pfeffer-Robbins-Nährlösung gezogen, wobei nur die Konzentration der Nährionen sich änderte; Spurenelemente und Glukose waren gleich wie in allen übrigen Versuchen. Verglichen wurde die gegenseitige Hemmung von Pilz und Mais in verdünnter und normal konzentrierter Nährlösung. Da man vermuten muss, dass umgekehrt auch höhere Pflanzen den Mikroorganismen Nährstoffe

streitig machen können, habe ich auch die Entwicklung von *Penicillium citrinum* beobachtet.

Mais und Pilz verhalten sich in Einzelkultur verschieden. Während Mais in der verdünnten Nährlösung nicht schlechter wächst, kann *Penicillium citrinum* kaum gedeihen (Tab. 9). Der Pilz bildet auf der Kulturlösung keine zusammenhängende Decke, sondern Einzelkolonien. Nach etwa sechs Tagen erscheinen nur in wenigen Kolonien Sporen. Das Trocken- und Aschengewicht fällt in der verdünnten Nährlösung deutlich geringer aus (Tab. 9).

Tabelle 9

Penicillium citrinum: Einfluss der Nährionenkonzentration. Kulturdauer 7 Tage. Glukose 0,5%. Temperatur etwa 20 °C. Mittelwerte aus je 8 Kolben. Konzentration 1: normal konzentrierte Pfeffer-Robbins-Nährlösung

Konzentration der Nährlösung	Trockengewicht mg	Asche mg
1	142 ±3	30 ±4
0,25	59 ±5	6 ±0,4
Hemmung durch geringere Nährionenkonzentration	58%	78%

Aus Tabelle 10 sieht man, wie *Penicillium citrinum* in den verschieden konzentrierten Nährlösungen auf *Zea Mays* einwirkt. In beiden Nährsubstraten wird Mais gehemmt. Dort, wo Mais weniger Ionen zur Verfügung stehen, wird er durch den Pilz stärker beeinträchtigt. Die geringere Nährionenkonzentration vermag zwar Mais in Einzelkultur nicht sichtbar zu beeinflussen, doch genügt diese unteroptimale Nährlösung, dass der eine Partner den andern mehr hemmen kann.

Tabelle 10

Zea Mays und *Penicillium citrinum* in Mischkultur. Hemmung von Mais durch den Pilz bei verschiedenen Nährionenkonzentrationen. Vorkultur des Maises: 7 Tage in normal konzentrierter Nährlösung. Mischkultur: 7 Tage bei verschiedenen Konzentrationen der Pfeffer-Robbins-Nährlösung (1: normale Konzentration). Temperatur etwa 20 °C. Tageslänge 14 Stunden. Mittelwerte aus je 10 Pflanzen

	Konzentration 1			Konzentration 0,25		
	einzeln	mit Pilz	Effekt	einzeln	mit Pilz	Effekt
Sprosslänge in cm	51 ±1	44 ±2	—14%	47 ±3	33 ±2	—30%
Wurzellänge in cm	66 ±2	55 ±2	—17%	56 ±2	43 ±3	—23%
Trockengewicht in mg	261 ±2	211 ±6	—19%	242 ±4	179 ±5	—26%
Asche in mg	37 ±1	31 ±2	—16%	37 ±3	25 ±1	—32%

Auch *Penicillium citrinum* wird in der verdünnten Nährlösung stärker gehemmt (Tab. 11). Dass sich diese Ionenkonzentration für den Pilz ungünstig auswirkt, zeigt sich schon durch sein Verhalten in Einzelkultur (Tab. 9). *Penicillium citrinum* kann trotzdem in dieser Nährlösung *Zea Mays* im Wachstum mehr hindern. Der Pilz bildet keine Scheiden um die Wurzeln, er wächst in Einzelkolonien räumlich getrennt

von Mais. *Penicillium citrinum* beeinflusst offenbar *Zea Mays* durch sein Antibiotikum und konkurriert mit ihm um Nährionen.

Tabelle 11

Penicillium citrinum und *Zea Mays* in Mischkultur. Hemmung des Pilzes durch Mais bei verschiedenen Nährionenkonzentrationen. Kulturdauer auf verschieden konzentrierter Pfeffer-Robbins-Nährlösung (1: normale Konzentration) 7 Tage. Temperatur etwa 20 °C. Mittelwerte aus je 10 Kolben

Konzentration	Trockengewicht in mg			Asche in mg		
	einzeln	mit Mais	Effekt	einzeln	mit Mais	Effekt
1	142±3	93±5	—35%	30±4	19±1	—37%
0,25	59±5	16±1	—73%	6±0,5	3±0,5	—50%

Abbildung 8

Einfluss der Nährionenkonzentration auf die Citrininbildung durch *Penicillium citrinum* in Einzel- und Mischkultur mit *Zea Mays*. Kulturdauer 7 Tage. Glukose 0,5%. Pfeffer-Robbins-Nährlösung der Konzentration 1 beziehungsweise 0,25. TG Trockengewicht des Pilzes. A Einzelkultur des Pilzes, B Mischkultur

Bei beiden Nährionenkonzentrationen bildet *Penicillium citrinum* in Mischkultur mehr Citrinin (Abb. 8). In der verdünnten Nährlösung entsteht in Mischkultur sehr

viel Antibiotikum. Der Pilz produziert Citrinin unabhängig davon, ob er schlecht oder gut wächst.

Avena sativa in Mischkultur mit Penicillium citrinum, Penicillium patulum und Aspergillus terreus

Mit Hafer als Partner von Mikroorganismen haben sich viele Autoren beschäftigt. Bodenmikroben ermöglichen dem Hafer, organisch gebundene Phosphationen aufzunehmen, indem sie diese lösen (Gerretsen, 1948). Gebgardt und Koval'chuk (1958) haben festgestellt, dass Keimpflanzen von Hafer Vitamine des B-Komplexes, wie Thiamin, Pyridoxin und Biotin, die *Azotobakter* bildet, aufnehmen. Mikroorganismen können aber auch von Hafer profitieren (Timonin, 1940 a; Rovira, 1956 a, 1956 c; Parkinson und Chesters, 1958; Zinov'eva, 1958). Martin (1958) hat sich mit der Scopoletinabgabe von Haferkeimwurzeln befasst. Er hat beobachtet, dass Patulin die Stoffabgabe hemmt, während Penicillin gerade den entgegengesetzten Effekt ausübt.

Auch in meinen Versuchen habe ich die Scopoletinbildung beachtet. Ich habe Hafer allein und in Mischkultur mit *Penicillium citrinum*, *Penicillium patulum* und *Aspergillus terreus* in einer Knop-Nährlösung wachsen lassen. Die sterile Aufzucht erfolgte nach Martin (1957). Da Scopoletin fluoresziert, konnte es mit einer UV-Lampe direkt an lebenden Wurzeln beobachtet werden. Die Wurzelspitzen zeigten hinter dem Vegetationspunkt die grösste Fluoreszenz. Wurzeln, die von den Pilzen berührt wurden, fluoreszierten nach einigen Tagen nicht mehr. Aber die unverpilzten Wurzeln und die der steril aufgezogenen Pflanzen bildeten während der ganzen Dauer der Kultur Scopoletin.

Tabelle 12 zeigt, wie *Aspergillus terreus*, *Penicillium citrinum* und *Penicillium patulum* auf Hafer wirken. Hafer wurde sieben Tage vorkultiviert. Die Mischkulturen, die nach einer Woche abgebrochen wurden, wuchsen auf Knop-Nährlösung mit 0,5% Glukose. Alle Pilze hemmten die Entwicklung von Hafer, Längenwachstum und Trockengewicht, am geringsten *Aspergillus terreus* und am stärksten *Penicillium patulum*. Alle drei Pilze beeinflussen das Aschengewicht nicht.

Tabelle 12

Hemmung von *Avena sativa* in Mischkultur mit Pilzen. Vorkultur von *Avena* 7 Tage; Mischkultur 7 Tage. Temperatur etwa 20 °C. Tageslänge 14 Stunden. Knop-Nährlösung mit 0,5% Glukose

	Avena einzeln	*Aspergillus terreus* abs. Wert	Effekt	*Penicillium citrinum* abs. Wert	Effekt	*Penicillium patulum* abs. Wert	Effekt
Sprosslänge cm	22±1	23±1	0	18±1	—18%	16±2	—27%
Wurzellänge cm	16±0,5	13±0,5	—18%	12±1	—25%	11±1	—31%
Trockengewicht mg	42±3	33±4	—21%	30±3	—29%	29±3	—31%
Asche mg	3±1	3±1	0	3±1	0	2±1	0

Hafer fördert die drei Pilze in ihrer Entwicklung (Tab. 13). *Penicillium patulum* weist in Mischkultur ein signifikant höheres Aschengewicht auf, wächst aber sonst

mit Hafer zusammen nicht besser als in Einzelkultur. Am meisten profitiert *Aspergillus terreus* von Hafer als Partner. In Einzelkultur wachsen alle Pilze, besonders *Aspergillus terreus*, nicht gerade gut auf Knop-Nährlösung, obwohl sie auch über 0,5 % Glukose verfügen. Durch Ausscheidung von bestimmten Stoffen ermöglicht wahrscheinlich Hafer den Pilzen, sich in dieser für sie wenig günstigen Nährlösung zu entwickeln. Ob und wie Scopoletin auf die Mikroorganismen wirkt, kann anhand dieser Versuche nicht abgeklärt werden.

Tabelle 13

Förderung der Pilze durch *Avena*. Vorkultur von *Avena* 7 Tage; Mischkultur 7 Tage. Glukose 0,5 %

	Trockengewicht in mg			Asche in mg		
	einzeln	mit *Avena*	Effekt	einzeln	mit *Avena*	Effekt
Penicillium patulum	89±3	94±1	0	7±0,2	9±0,2	+29 %
Penicillium citrinum	122±1	151±5	+24 %	18±1	24±2	+33 %
Aspergillus terreus	86±3	124±3	+44 %	12±1	18±3	+50 %

Auch die Antibiotikumproduktion gibt Aufschluss über das Verhältnis zwischen den Pilzen und Hafer. *Penicillium citrinum* und *Aspergillus terreus* bilden nach einer

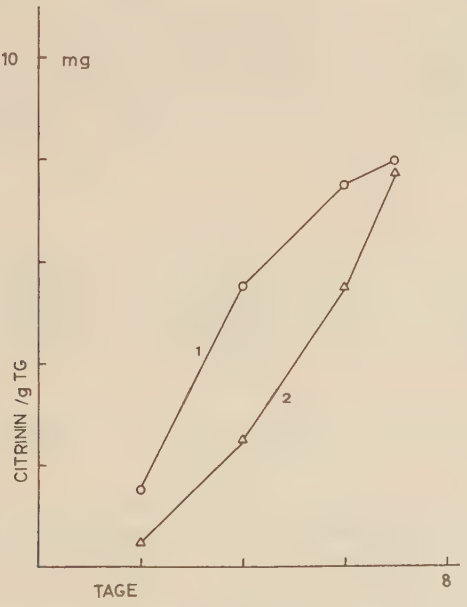

Abbildung 9

Einfluss von *Avena sativa* auf die Citrininproduktion von *Penicillium citrinum* und *Aspergillus terreus*. Mischkultur 7 Tage. Knop-Nährlösung mit 0,5 % Glukose. TG Trockengewicht der Pilze. Beide Pilze bilden in Einzelkultur kein Citrinin. 1 *Penicillium citrinum*, 2 *Aspergillus terreus*

Woche Kultur mit Hafer etwa gleichviel Citrinin pro g Trockengewicht (Abb. 9). Verglichen mit der Mischkultur mit Mais entsteht nur wenig Citrinin. In Einzelkultur wird auf Knop-Nährlösung kein Antibiotikum gebildet. Sowohl Mais als auch Hafer ermöglichen den Pilzen, auf einer ungeeigneten Nährlösung Citrinin zu bilden. Mais hemmt aber die Pilze, während Hafer ihre Entwicklung begünstigt.

Wie die andern beiden Pilze bildet auch *Penicillium patulum* sein Antibiotikum nur in Mischkultur mit Hafer (Abb. 10). Der Pilz produziert fast soviel Patulin wie in gemeinsamer Kultur mit Mais. Wegen dieses Antibiotikums wird Hafer in Mischkultur mit *Penicillium patulum* stärker gehemmt als durch die beiden andern Pilze.

Martin (1958) hat beobachtet, dass Patulin die Scopoletinbildung von Haferwurzeln hemmt. Auch in meinen Versuchen hörten die Wurzeln, die mit dem Pilz in Berührung kamen, auf zu fluoreszieren. Nach Martin (1958) kann eine Konzentration von 10^{-7} mol/l Patulin Hafer noch hemmen.

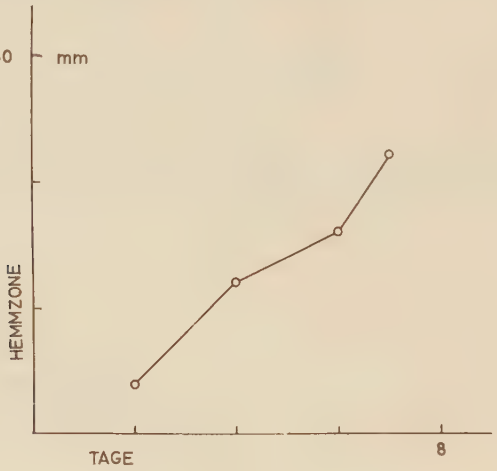

Abbildung 10

Einfluss von *Avena sativa* auf die Antibiotikumbildung von *Penicillium patulum*. Kulturdauer 7 Tage. Knop-Nährlösung mit 0,5% Glukose. Mittelwerte aus 3 Versuchen zu 10 Kolben; Streuung 5%. Kurve: Mischkultur (in Einzelkultur bildet der Pilz keine nachweisbaren Mengen an Antibiotikum)

Pisum sativum in Mischkultur mit Aspergillus terreus, Penicillium citrinum und Penicillium patulum

Es ist auch interessant, zu sehen, wie sich eine dikotyle Pflanze in Mischkultur mit Pilzen verhält. Ich wählte für meine Versuche *Pisum sativum* L. Wie Mais und Hafer verfügt die keimende Erbse über Reservestoffe aus dem Samen; sie ist also nicht wie Orchideen auf Pilze angewiesen.

Da *Pisum sativum* eine wichtige Gemüsepflanze ist, hat man ihr Verhalten bei Infektionen durch pathogene Pilze studiert. Buxton (1958) hat festgestellt, dass die Wurzelausscheidungen einer Erbsensorte, die gegen *Fusarium oxysporum* resistent ist, die Sporen dieses Pilzes am Keimen hindern. Man hat bei pflanzlichen Infektions-

krankheiten auch ökologische Faktoren beachtet. Erbsen, die in einer für sie ungünstigen Temperatur wachsen, werden durch den pathogenen Pilz *Thielaviopsis basicola* stärker befallen (Lloyd und Lockwood, 1963).

Tabelle 14

Hemmung von *Pisum sativum* in Mischkultur mit verschiedenen Pilzen. Vorkultur von *Pisum* 7 Tage; Mischkultur 7 Tage auf Knop-Nährlösung mit 0,5% Glukose

	Pisum	*Aspergillus terreus*		*Penicillium citrinum*		*Penicillium patulum*	
	einzeln	abs. Wert	Effekt	abs. Wert	Effekt	abs. Wert	Effekt
Sprosslänge cm	31 ± 0,8	27 ± 0,8	—13%	25 ± 2	—19%	23 ± 1,5	—26%
Trockengewicht des Sprosses mg	90 ± 1	78 ± 1,5	—13%	74 ± 1	—18%	71 ± 2	—21%
Trockengewicht der Wurzel mg	47 ± 1	40 ± 1	—15%	37 ± 2,5	—21%	36 ± 3	—23%
Asche des Sprosses mg	15 ± 0,1	13 ± 0,1	—13%	12 ± 0,5	—20%	10 ± 1,4	—33%
Asche der Wurzel mg	10 ± 0,5	8 ± 0,5	—20%	6 ± 0,9	—40%	4 ± 1	—60%

Ich zog Erbsen auf Knop-Nährlösung einzeln und in Mischkultur mit *Aspergillus terreus*, *Penicillium citrinum* und *Penicillium patulum*. Die Kulturen verfügten über 0,5% Glukose. Alle Pilze hemmen die Erbsen (Tab. 14). *Penicillium patulum* beeinträchtigt sowohl Hafer als auch Erbsen am stärksten. Doch im Gegensatz zu Hafer weisen die Erbsen in Mischkultur mit jedem Pilz ein deutlich geringeres Aschengewicht auf als in Einzelkultur.

Tabelle 15

Förderung der Pilze in Mischkultur mit *Pisum sativum*. Kultur: 7 Tage auf Knop-Nährlösung mit 0,5% Glukose. Temperatur etwa 24 °C. Mittelwerte aus je 10 Kolben

	Trockengewicht in mg			Asche in mg		
	einzeln	mit *Pisum*	Effekt	einzeln	mit *Pisum*	Effekt
Aspergillus terreus	141 ± 5	205 ± 6	+45%	25 ± 4	39 ± 5	+56%
Penicillium patulum	143 ± 4	181 ± 5	+27%	24 ± 2	30 ± 2	+25%
Penicillium citrinum	162 ± 2	183 ± 2	+13%	28 ± 1	33 ± 1	+18%

Wie Mais und Hafer fördert auch *Pisum sativum* das Wachstum von *Penicillium patulum* und *Aspergillus terreus* (Tab. 1, 13 und 15). *Aspergillus terreus* wird von Hafer und Erbsen am stärksten begünstigt. Eine Sonderstellung nimmt *Penicillium citrinum* ein. Durch Mais wird dieser Pilz gehemmt, während er sich in Mischkultur mit Hafer und Erbsen besser entwickelt als in Einzelkultur. Alle Pilze wachsen auf Knop-Nähr-

lösung mit Zusatz von gleich viel Zucker und Spurenelementen wie in Pfeffer-Robbins-Nährlösung so schlecht, dass sich Einzel- und Mischkulturen auch dann stark voneinander unterscheiden, wenn die höheren Pflanzen nur wenig von den Stoffen ausscheiden, die den Pilzen offenbar das Wachstum ermöglichen. Nach Katznelson, Rouatt und Payne (1955) und Rovira (1956 b) sollen Hafer und Erbswurzeln Aminosäuren und Zucker ausscheiden.

In Mischkultur mit *Pisum sativum* bildet nur *Penicillium patulum* sein Antibiotikum (Abb. 11). Das erklärt auch, wieso *Penicillium patulum* die Erbsen am stärksten hemmt. Die Erbsen vermögen nicht wie Hafer *Penicillium citrinum* und *Aspergillus terreus* zur Citrininproduktion anzuregen.

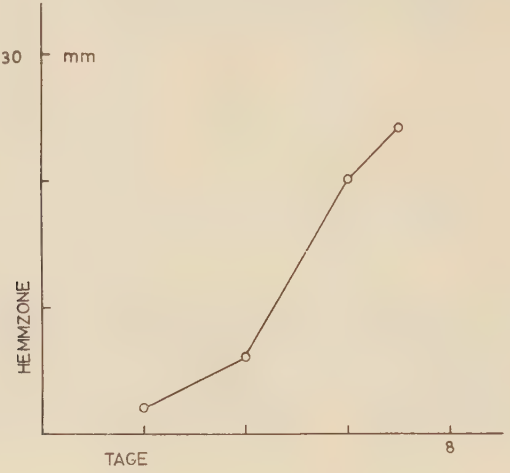

Abbildung 11

Einfluss von *Pisum sativum* auf die Antibiotikumbildung von *Penicillium patulum*. Vorkultur, Erbse 7 Tage. Knop-Nährlösung mit 0,5 % Glukose. Mittelwerte aus 3 Versuchen zu 10 Kolben; Streuung 5 %. Kurve: Mischkultur (in Einzelkultur bildet der Pilz keine nachweisbaren Mengen an Antibiotikum)

Diskussion

In der Natur bestehen Wechselwirkungen zwischen höheren Pflanzen und den Mikroorganismen im Boden. Pilze bilden mit Wurzeln bestimmter Pflanzen Mykorrhizen. *Leguminosen*-Wurzeln sind mit Knöllchenbakterien, die Luftstickstoff binden, infiziert. Andere Mikroorganismen wieder schädigen die höheren Pflanzen. Viele Mikroben leben in der Rhizosphäre, ohne eine spezifische Beziehung mit den Wurzeln einzugehen. Das Experiment soll zeigen, ob eine höhere Pflanze und ein Mikroorganismus, zum Beispiel ein Pilz, physiologisch fähig sind, sich gegenseitig zu beeinflussen. In den aseptischen Versuchen schliesst man die andern Mikroorganismen aus. Auch wachsen die Partner in einem bestimmten, vereinfachten Milieu. Aus solchen Ver-

suchen geht daher nur hervor, ob zwei Organismen aufeinander einwirken können; aber nicht, ob und wie sich die beiden Partner in der freien Natur beeinflussen.

Ökologische Verhältnisse bestimmen das Gleichgewicht zwischen Mikroorganismen und höheren Pflanzen. Eine wichtige Rolle spielt zum Beispiel das Wasser im Boden. Caron (1895) hat in warmen und trockenen Sommern mehr Bakterien in der Rhizosphäre von höheren Pflanzen gefunden als in feuchten Sommern. Später hat Timonin (1940 b) im Wurzelhorizont von Flachs bei einer Feuchtigkeit von 30% der Wasserkapazität des betreffenden Bodens mehr Mikroorganismen festgestellt als bei einem doppelt so hohen Wassergehalt. In einem nassen Boden vermögen pathogene Pilze Wurzeln besser zu befallen, als wenn der Boden trocken ist. *Phytophtora cactorum* infiziert die Wurzeln des Birnbaums nur dann, wenn der Boden reichlich bewässert wird (McIntosh und O'Reilly, 1963). In meinen Versuchen hemmen sich Mais und *Penicillium citrinum* gegenseitig stärker bei ungeeigneten ökologischen Verhältnissen. Eine überoptimale Temperatur wirkt sich für die Mischkultur ungünstig aus (Tab. 4 und 5). Die Temperatur spielt bei der Infektion von Wurzeln durch parasitische Pilze eine Rolle. Wächst eine höhere Pflanze bei einer für sie zu hohen oder zu tiefen Temperatur, so ist sie gegenüber den pathogenen Mikroorganismen weniger resistent. Lloyd und Lockwood (1963) haben das an Erbsen mit *Thielaviopsis basicola* beobachtet, während Husain und McKeen (1963) berichten, dass Erdbeerwurzeln nur in kaltem Boden von *Rhizoctonia fragariae* geschädigt werden. In einer für Mais optimalen Tageslänge kann er sich gegenüber *Penicillium citrinum* besser behaupten; das Gleichgewicht wird zuungunsten des Pilzes verschoben (Abb. 4). Andere Pflanzen, die in optimalen Lichtverhältnissen leben, können durch vermehrte Kohlenhydratproduktion und -ausscheidung Mikroorganismen im Boden fördern (Björkman, 1942; Harley und Waid, 1956, und Rovira, 1959). Dieser Gegensatz zeigt, dass nicht eine einzige Umweltsbedingung, sondern die Summe aller Faktoren, ökologischer und anderer Art, die Beziehungen zwischen höheren Pflanzen und Mikroorganismen beeinflusst. Auch die Reaktion des Bodens, beziehungsweise des Nährmilieus, trägt zur Lage des Gleichgewichts zwischen höheren Pflanzen und Mikroorganismen bei. Meine Versuche mit Mais und *Penicillium citrinum* als Partner bei verschiedenen konstanten pH-Werten zeigen zwar, dass die optimale Reaktion für einen Partner ihn in der Mischkultur nicht begünstigt (Abb. 6). Doch greift die Wasserstoffionenkonzentration indirekt in die wechselseitigen Beziehungen zwischen den beiden Organismen ein, indem sie die Citrininbildung in Mischkultur beeinflusst (Abb. 7). In der freien Natur neutralisiert Mais den Boden, so dass Mikroorganismen ohne extreme pH-Ansprüche in seinem Wurzelhorizont leben können (Thom und Humfeld, 1932). Die Menge und Art der Nährionen stellt einen der wichtigsten ökologischen Faktoren dar. Sind zuwenig Ionen vorhanden, so konkurrieren Mais und Pilz darum (Tab. 10 und 11). Das äussert sich darin, dass in verdünnter Nährlösung die beiden Partner in gemeinsamer Kultur gegenüber den einzeln gewachsenen Kontrollen stärker zurückstehen als in normal konzentrierter Nährlösung. In natürlichen Verhältnissen können Mikroorganismen den höheren Pflanzen Nährstoffe aufschliessen (Fred und Haas, 1919; Gerretsen, 1948, und Estermann und McLaren, 1961).

Avena sativa als Partner von Mikroorganismen beziehungsweise Pilzen ist darum interessant, weil diese Pflanze fluoreszierendes Scopoletin ausscheidet. Martin (1958) hat beobachtet, dass Kulturfiltrate von Bakterien und Pilzen die Scopoletinabgabe

durch die Wurzeln anregen. Ich stellte fest, dass im Verlauf der Mischkulturen die Wurzeln, die mit den Pilzen in Kontakt kamen, nicht mehr fluoreszierten. Hafer wird durch alle drei Pilze gehemmt, und die Pilze werden dabei gefördert (Tab. 12 und 13).

Die Erbse, *Pisum sativum*, die als Beispiel für eine dikotyle Pflanze gewählt wurde, ist als Partnerin von Pilzen darum interessant, weil sie in der Natur mit Knöllchenbakterien eine charakteristische Symbiose eingeht. Auch scheidet die Erbse wie Hafer und andere Pflanzen durch die Wurzeln Aminosäuren und Zucker aus, die den Bodenmikroorganismen zugute kommen (Katznelson, Rouatt und Payne, 1955, und Rovira, 1956 b und c). In meinen Versuchen mit Knop-Nährlösung verhält sich *Pisum sativum* wie Hafer: Die Erbsen fördern die Pilze, werden aber von ihnen gehemmt.

Die Rolle, die die Antibiotika bei den Wechselwirkungen zwischen höheren Pflanzen und Mikroorganismen spielen, ist vielseitig und oft undurchsichtig. Die Resistenz höherer Pflanzen gegenüber pathogenen Mikroorganismen kann von der Anwesenheit eines Antibiotikums im Boden abhängen. Entweder produziert die höhere Pflanze das Antibiotikum selbst, oder es stammt von einem Bodenmikroorganismus (Eaton und Rigler, 1946). Ferner vermögen Antibiotika die Stoffaufnahme von Pflanzen zu beeinflussen (Frei, 1963; Hool, 1967). Aber auch die Abgabe von Substanzen durch die Wurzeln kann durch Antibiotika gesteuert werden (Martin, 1958). Sowohl die Stoffaufnahme als auch -abgabe der höheren Pflanze ist abhängig von der Art der Konzentration des betreffenden Antibiotikums. Weiter entscheiden Mikroorganismen, wieviel von den dem Kultursubstrat zugesetzten Antibiotika höhere Pflanzen aufnehmen (Krasil'nikov, 1957). In der Natur kann eine höhere Pflanze indirekt die Zusammensetzung der Mikroflora ihres Wurzelhorizontes bestimmen, wenn sie Mikroorganismen fördert, die Antibiotika produzieren (Vidal und Leborgne, 1964). Im Bereich dieser Pflanze gedeihen dann nur solche Mikroben, die die betreffenden Antibiotika ertragen. Höhere Pflanzen, die selbst Antibiotika bilden, beeinflussen die Rhizosphärenflora direkt (Willeke und Winter, 1951). In meinen Versuchen werden alle höheren Pflanzen durch die Pilze gehemmt. Doch ist die Antibiotikumproduktion der Pilze nicht allein entscheidend für das gegenseitige Verhältnis der Partner in gemeinsamer Kultur. *Pisum sativum* wird von *Aspergillus terreus* und *Penicillium citrinum* gehemmt, obwohl diese Pilze in Mischkultur mit der Erbse kein Antibiotikum bilden. Auch wird Mais nicht unter allen Bedingungen proportional der Antibiotikumkonzentration beeinträchtigt, was die Versuche mit verschiedener Temperatur und Tageslänge zeigen. Die höheren Pflanzen, ausser Erbse, haben die Antibiotikumbildung der Pilze gefördert oder sogar ermöglicht (Abb. 9 und 10).

Meine Versuche und auch Angaben anderer Autoren zeigen, dass man kaum Allgemeines über das Zusammenleben von höheren Pflanzen mit saprophytischen Mikroorganismen aussagen kann. Äussere Faktoren, die Art und der Zustand der Partner entscheiden über das gegenseitige Verhältnis.

Zusammenfassung

1. Einige Kulturpflanzen, *Zea Mays*, *Pisum sativum* und *Avena sativa*, wurden einzeln und in gemeinsamer Kultur mit je einem Pilz, *Penicillium citrinum*, *Penicillium patulum* und *Aspergillus terreus*, gezogen.

2. Die Kultur erfolgte aseptisch.

3. Es wurde die Länge der höheren Pflanzen sowie das Trocken- und Aschengewicht dieser und der Pilze ermittelt.

4. Die Antibiotikumbildung der Pilze wurde mit dem Oxfordtest bestimmt.

5. Citrinin wurde zudem aus der Kulturlösung isoliert und gewogen.

6. Mais hemmt *Penicillium citrinum*, fördert aber *Penicillium patulum* und *Aspergillus terreus*. *Penicillium citrinum* bildet in Mischkultur mit Mais mehr Citrinin als in Einzelkultur.

7. Bei einer Nährlösungstemperatur von 35 °C hemmen sich Mais und *Penicillium citrinum* gegenseitig stärker als bei 25 °C.

8. Bei einer für Mais optimalen Tageslänge von 14 Stunden wird dieser durch *Penicillium citrinum* weniger beeinträchtigt als im 7- und 21-Stunden-Tag.

9. Mais wird durch den Pilz bei pH 2 am stärksten gehemmt, während *Penicillium citrinum* in Mischkultur bei pH 4 am meisten beeinträchtigt wird.

10. In einer vierfach verdünnten Pfeffer-Robbins-Nährlösung hemmen Mais und *Penicillium citrinum* einander stärker als in einer normal konzentrierten Nährlösung.

11. *Avena sativa* fördert *Penicillium patulum*, *Penicillium citrinum* und am meisten *Aspergillus terreus*, wird aber von allen drei Pilzen im Wachstum gehemmt.

12. *Pisum sativum* verhält sich gleich wie *Avena sativa*.

13. Unter den gewählten Versuchsbedingungen fördern, ja ermöglichen Mais, *Avena* und *Pisum* in manchen Fällen die Bildung von Antibiotika durch *Penicillium citrinum* und *Penicillium patulum*.

Die vorliegende Arbeit entstand im Botanischen Institut der Universität Basel auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber, dem ich für seine Hilfe und sein ständiges Interesse herzlich danke.

Akhromeiko A.I. und V.A. Shestakova. 1958. A study of the role of microorganisms in the uptake and release of phosphorus and sulphur by seedlings of maple, oak and ash. Mikrobiologija **27**, 66–73.

Barker H.A. und T.C. Broyer. 1942. Notes on the influence of microorganisms on growth of squash plants in water culture with particular reference to manganese nutrition. Soil Sci. **53**, 467–477.

Björkman E. 1942. Über die Bedingungen der Mykorrhizabildung bei Kiefer und Fichte. Symbol. Bot. Upsal. **6**, 2–191.

Bowen G.D. 1961. The toxicity of legume seed diffusates toward rhizobia and other bacteria. Plant and Soil **15**, 155–165.

Bürgin-Wolff A. 1959. Untersuchungen über die Infektion von Wurzeln durch Knöllchenbakterien. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **69**, 75–112 (Diss. Basel).

Burlet E. 1940. Über die pflanzliche Organkultur und ihre Anwendung bei physiologischen Untersuchungen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **50**, 519–544 (Diss. Basel).

Buxton E.W. 1958. A Change of Pathogenic Race in *Fusarium oxysporum* f. pisi Induced by Root Exudate from a Resistant Host. Nature **181**, 1222–1224.

Caron A. 1895. Landwirtschaftlich-bakteriologische Probleme. Landw. Versuchsstat. **45**, 401–418.

Clark F.E. 1949. Soil Microorganisms and Plant Roots. Adv. Agr. **1**, 241–288.

Eaton F.M. und N.E. Rigler. 1946. Influence of carbohydrate levels and root-surface microfloras on *Phymatotrichum* root rot in cotton and maize plants. J. agric. Res. **72**, 137–161.

Estermann E.F. und A.D. McLaren. 1961. Contribution of rhizoplane organisms to the total capacity of plants to utilize organic nutrients. Plant and Soil **15**, 243–260.

Fred E.B. und A.R.C. Haas. 1919. The etching of marble by roots in the presence and absence of bacteria. J. Gen. Physiol. **1**, 631–638.

Frei P. 1963. Die Aufnahme von Strontium durch *Zea Mays* L. in Mischkultur mit Bodenpilzen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **73**, 21–58 (Diss. Basel).

Gebgardt A.G. und S.I. Koval'chuk. 1958. The effect of the introduction of *Azotobacter* upon the vitamin content of the soil and oat seedlings. Mikrobiologija **27**, 326–329.

Gerdemann J.W. 1965. Vesicular-arbuscular mycorrhizae formed on maize and tuliptree by *Endogone fasciculata*. Mycologia **57**, 562–575.

Gerretsen F.C. 1937. Manganese Deficiency of Oats and its Relation to Soil Bacteria. Ann. Bot. N.S. **1**, 208–230.

— 1948. The Influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. Plant and Soil **1**, 51–81.

Harley J.L. und J.S. Waid. 1956. The effect of light upon the roots of beech and its surface population. Plant and Soil **7**, 96–112.

Hetherington A.C. und H. Raistrick. 1931. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, Citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. Phil. Trans. Roy. Soc. **220**, 269–295.

Hool G. 1967. Wirkung von Antibiotika auf Wachstum und Ionenaufnahme bei *Zea Mays* L. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **77**, 210–256 (Diss. Basel).

Husain S.S. und W.E. McKeen. 1963. Interactions between Strawberry Roots and *Rhizoctonia fragariae*. Phytopath. **53**, 541–545.

Kato J., Y. Shiotani, S. Tamura und A. Sakurai. 1964. A New Plant Growth-promoting Substance: Helminthosporol. Naturwissenschaften **51**, 341.

Katznelson H., J.W. Rouatt und T.M.B. Payne. 1955. The liberation of amino acids and reducing compounds by plant roots. Plant and Soil **7**, 35–48.

Kerr A. 1956. Some Interactions between Plant Roots and Pathogenic Soil Fungi. Austr. J. biol. Sci. **9**, 45–52.

Klarman W.L. und J.W. Gerdemann. 1963. Resistance of soybeans to three *Phytophtora* Species due to the production of a phytoalexin. Phytopathology **53**, 1317–1320.

Krasil'nikov N.A. 1957. On the importance of soil microorganisms in plant nutrition. Mikrobiologija **26**, 637–650.

— und V.V. Kotelev. 1959. Adsorption of phosphatases of soil microorganisms by corn roots. Mikrobiologija **28**, 515–517.

Krüger W. und W. Schneidewind. 1901. Zersetzungen und Umsetzungen von Stickstoffverbindungen im Boden durch niedere Organismen und ihr Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen. Landw. Jahrbücher **30**, 633–648.

Läuchli A. 1966. Ionentransport durch Wurzeln intakter Keimpflanzen von *Zea Mays* L. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **75**, 5–19.

Ledingham R.J., B.J. Sallans und P.M. Simmonds. 1949. The significance of the bacterial flora on wheat seed in inoculation studies with *Helminthosporium sativum*. Scientific Agriculture **29**, 253–262.

Lloyd A.B. und J.L. Lockwood. 1963. Effect of Soil Temperature, Host Variety, and Fungus Strain on *Thielaviopsis* Root Rot of Peas. Phytopathology **53**, 329–331.

Martin P. 1957. Die Abgabe von organischen Verbindungen, insbesondere von Scopoletin, aus den Keimwurzeln des Hafers. Zeitschr. Bot. **45**, 475–506.

— 1958. Einfluss der Kulturfiltrate von Mikroorganismen auf die Abgabe von Scopoletin aus den Keimwurzeln des Hafers (*Avena sativa* L.). Arch. Mikrobiol. **29**, 154–168.

McIntosh D.L. und H.J. O'Reilly. 1963. Evaluating Effects of Factors that Influence Infection of Pear Rootlets by *Phytophtora cactorum*. Phytopathology **53**, 1372–1373.

Melin E. 1954. Growth factor requirements of mycorrhizal fungi of trees. Svensk Bot. Tidskrift **48**, 86–94.

Paech K. und M.V. Tracey. 1956. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Berlin, Göttingen, Heidelberg.

Parkinson D. und C.G.C. Chesters. 1958. Occurrence of *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. in the Rhizosphere of Oats. Nature **181**, 1746–1747.

— und J.H. Clarke. 1961. Fungi associated with the seedling roots of *Allium porrum* L. Plant and Soil **13**, 384–390.

Pedretti E. 1958. Über Bestimmung und Verteilung autochthoner Spurenelemente in jungen Maispflanzen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **68**, 103–145 (Diss. Basel).

Pollock A.V. 1947. Production of Citrinin by Five Species of *Penicillium*. Nature **160**, 331–332.

Rangaswami G. und P. Vidyasekaran. 1963. Antibiotic Production by *Streptomyces* sp. in Corn Rhizosphere. Phytopathology **53**, 995–997.

Rasnizina E.A. 1938. Formation of growth substances (auxin-type) by bacteria. C. R. Acad. Sci. URSS, N. S. **18**, 353–355.

Rauen H.M. 1964. Biochemisches Taschenbuch, Berlin.

Rivière J. 1963. Action des microorganismes de la rhizosphère sur la croissance du blé. II. Isolement et caractérisation des bactéries produisant des phytohormones. Ann. Inst. Pasteur **105**, 303–313.

Rovira A.D. 1956 a. A study of the development of the root surface microflora during the initial stages of plant growth. J. appl. Bact. **19**, 72–79.

— 1956 b. Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. I. The nature of root exudate from oats and peas. Plant and Soil **7**, 78–194.

— 1956 c. II. A study of the properties of root exudate and its effect on the growth of microorganisms isolated from the rhizosphere and control soil. Plant and Soil **7**, 195–207.

— 1959. IV. Influence of plant species, age of plant, light, temperature, and calcium nutrition on exudation. Plant and Soil **11**, 53–64.

Sadovskaya R.O. 1959. Effect of grape-root-system on growth of *Azotobacter*. Mikrobiologija **28**, 534–540.

Samuel G. und F.J. Greaney. 1938. Some observations on the occurrence of *Fusarium culmorum* on wheat. Trans. Brit. Mycol. Soc. **21**, 114–117.

Schroth M.N. und D.S. Teakle. 1963. Influence of Virus and Fungus Lesions on Plant Exudation and Chlamydospore Germination of *Fusarium solani* f. phaseoli. Phytopathology **53**, 610–612.

— T.A. Toussoun und V.C. Snyder. 1963. Effect of Certain Constituents of Bean Exudate on Germination of Chlamydospores of *Fusarium solani* f. phaseoli in Soil. Phytopathology **53**, 809–812.

Schüepp O. und Ch.-Y. Chang. 1938. Der Einfluss der Lichtintensität auf Wachstum und Differenzierung des Sprosses von *Sinapis alba* L. Verh. Natf. Ges. Basel **49**, 93–117.

Seiler L. 1951. Über das Wurzelwachstum und eine Methode zur quantitativen Untersuchung des Einflusses von Wirkstoffen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **61**, 622–663 (Diss. Basel).

Steinberg R.A. 1947. Growth Responses of Tobacco Seedlings in Aseptic Culture to Diffusates of Some Common Soil Bacteria. J. agric. Res. **75**, 199–206.

Thom C. und H. Humfeld. 1932. Notes on the Association of Microorganisms and Roots. Soil Sci. **34,** 29–36.

Timonin M.J. 1940 a. The interaction of higher plants and Soil microorganisms. I. Microbial population of Rhizosphere of seedlings of certain cultivated plants. Can. J. Res. **18,** 307–317.

— 1940 b. II. Study of the microbial population of the rhizosphere in relation to resistance of Plants to soil-borne diseases. Can. J. Res. **18,** 444–456.

— 1941. III. Effect of by-products of plant growth on activity of fungi and actinomycetes. Soil Sci. **52,** 395–413.

Turner P.D. 1963. Influence of Root Exudates of Cacao and Other Plants on Spore Development of *Phytophtora palmivora.* Phytopathology **53,** 1337–1339.

Udagawa S., Y. Hashimoto und S. Hirayama. 1956. Comparative studies on the Citrinin-producting activity of different strains of *Penicillium citrinum.* Eisei Shikenjo Hôkoku **74,** 299–303.

Vidal G. und L. Leborgne. 1964. Nouvelles recherches sur la rhizosphère de la vigne. Ann. Inst. Pasteur **106,** 651–653.

Vöchting A. 1953. Über die Zinkaufnahme von *Zea Mays* L. und *Aspergillus niger* v. Tiegh. in Einzelkultur und in Mischkultur. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **63,** 103–162 (Diss. Basel).

West P.M. und A.G. Lochhead. 1940. Qualitative studies of soil microorganisms. IV. The rhizosphere in relation to the nutritive requirements of soil bacteria. Can. J. Res. **18,** 129–135.

Willeke L. und A.G. Winter. 1951. Untersuchungen über Antibiotika aus höheren Pflanzen und ihre Bedeutung für die Bodenmikrobiologie und Pflanzensoziologie. Naturwissenschaften **38,** 262–264.

Winter G. und R. von Rümker. 1950. Die Mikroflora der Rhizosphäre als resistenzbestimmender Faktor. Arch. Mikrobiol. **15,** 72–84.

Zinov'eva K.G. 1958. The effect of root excretions and root extracts of certain agricultural plants on *Azotobacter.* Mikrobiologija **27,** 74–80.

Curriculum vitae

Am 9. August 1941 wurde ich, Ursula Ebner, Tochter des Otto Lehmann, Zollbeamter in Basel, und seiner Frau Bertha geb. Reinhard, in Sumiswald geboren.

Ich besuchte in Basel die Primarschule und das Mädchengymnasium II, wo ich 1960 mit der kantonalen Maturität abschloss.

Im Herbst 1960 immatrikulierte ich mich an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel. Ich studierte Botanik, Chemie, physikalische Chemie und Bakteriologie-Hygiene, ergänzt durch Studien in Zoologie und Physik. In Chemie, physikalischer Chemie und Bakteriologie-Hygiene legte ich Nebenfachprüfungen ab. Im Frühling 1964 verheiratete ich mich mit Cuno Ebner aus Basel. Im Herbst dieses Jahres begann ich die vorliegende Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber.

Während meines Studiums besuchte ich die Vorlesungen und Praktika folgender Herren Professoren und Dozenten: M. Brenner, P. Buchner, H. Dahn, H. Erlenmeyer, S. Fallab, M. Geiger-Huber, C. Grob, P. Huber, W. Kuhn †, E. Miescher, H. Nüesch, A. Portmann, P. Schmid, J. Tomcsik † und H. Zoller.

Meinen verehrten Lehrern danke ich bestens.